云南植物研究 2006, **28** (2): 203~207
Acta Botanica Yunnanica

提高狗蔷薇离体培养植株再生频率*

余晓丽[1], 马剑敏[2], 李玉英[1], 王世茹[3]
(1 南阳师范学院生物系, 河南 南阳 473061; 2 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453002;
3 河南南阳农校园艺系, 河南 南阳 473000)

摘要: 以狗蔷薇 (*Rosa canina* Inermis) 为材料, 以MS为基本培养基, 通过对不同植物生长调节剂的组合, 大幅度提高了狗蔷薇离体培养植株再生频率。结果表明, 2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L 2,4-D 的组合较为适宜, 其不定芽再生率为87%, 增殖率为3.0; 而CPPU和2,4-D的适宜组合为1.5 mg/L+0.3 mg/L, 其不定芽再生率高达93%, 增殖率为5.0。同时, 研究结果显示, 以MS+40 g/L 蔗糖+6.0 g/L 琼脂粉+3.5 mg/L AgNO$_3$+1.5 mg/L CPPU+0.1 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L GA$_3$ 作增殖培养基效果最好, 不定芽诱导率为89%, 增殖率为5.5; 利于生根的培养基为1/4MS+20 g/L 蔗糖+3.5 g/L 琼脂+0.3%活性碳+0.1 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA, 生根率为91%。

关键词: 狗蔷薇; 植株再生; 组织培养
中图分类号: Q 945　　文献标识码: A　　文章编号: 0253-2700(2006)02-203-05

Improving of *in vitro* Plant Regeneration Frequency of *Rosa canina* (Rosaceae) Inermis

YU Xiao-Li[1], MA Jian-Min[2], LI Yu-Ying[1], WANG Shi-Ru[3]
(1 *Department of Biology*, *Nanyang Normal University*, Nanyang 473061, China; 2 *College of Life Science of Henan Normal University*, Xinxiang 453002, China; 3 *Department of Horticulture*, *Nanyang Agricultural School*, Nanyang 473000, China)

Abstract: An efficient regeneration system of *Rosa canina* Inermis was developed in this study. The results showed that the regeneration frequency of adventitious buds was 87% and the multiplication ratio was 3.0 when supplemented with 2.0 mg/L 6-BA and 0.3 mg/L 2,4-D on Murashige and Skoog (MS) medium, while the regeneration ratio was 93% and the multiplication ratio was 5.0 when the MS medium contained 1.5 mg/L CPPU and 0.2 mg/L 2,4-D. Moreover, the result also indicated that CPPU was more effective in the induction of adventitious buds. The optimal medium for the multiplication of shoots was MS+40g/L sucrose+6.0 g/L agar+3.5 mg/L AgNO$_3$+1.5mg/L CPPU+0.1 mg/L 2,4-D+0.05mg/L GA$_3$, in which the multiplication ratio was 5.5 and the adventitious bud induction frequency was 89%. The best medium for rooting and growing was 1/4MS+20 g/L sucrose+3.5g/L agar+0.3% activated carbon+0.1 mg/L IBA+0.1mg/LNAA. The rooting frequency was 91%.

Key words: *Rosa canina*; Plant regeneration; Tissue culture

狗蔷薇 (*Rosa canina* Inermis), 原产欧洲, 落叶灌木, 其长势强健, 无刺、耐寒, 抗性强 (梁艳华和彭春生, 2004), 在多种土壤中易于生根。狗蔷薇作为树月季砧木, 在国外已普遍用于园林绿化, 在中欧、北欧各国、美国近海地区, 应用历史较长 (de Dood 等, 1990), 而我国对树

---

* 基金项目: 南阳师范学院2003年应用与科技开发项目 (nytc200318); 河南省南阳市2004年科技攻关项目 (200404016)
收稿日期: 2005-07-06, 2006-02-28 接受发表

作者简介: 余晓丽 (1963-) 女, 副教授, 主要从事细胞生物学教学和植物细胞培养研究。
E-mail: yxl1268@125.com, 联系电话: 13838721912

月季的生产和应用刚刚起步。2002 年从法国引种试验表明，在未加任何防寒措施的情况下，它们 100% 都能在北京露地越冬，但其成本较高。目前国内能生产树月季的基地不多，在园林绿化方面还要推广和示范，在生产上也需要改进和提高。

目前蔷薇属植物的离体培养已多有报道，但不同种及个体的差异较大，有些再生较易，有些再生较困难。国外有多篇关于现代月季植株再生体系的研究报道，在他们的研究中多采用茎尖、叶片、侧芽，但再生频率普遍较低，对砧木的快繁少之又少 (杨倩和彭春生，2003)。狗蔷薇离体培养植株再生体系的建立国内外尚未见报道。本试验用生产树月季中应用较多的狗蔷薇茎段进行再生研究，通过不同类型植物生长调节剂 (plant grown regulator，PGR) 组合的筛选，进行提高狗蔷薇离体培养和植株再生频率的研究，为通过遗传转化途经进行树月季优良砧木选育、改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采用的砧木材料－狗蔷薇 (*Rosa canina* Inermis) 法国购进。

1.2 材料处理

狗蔷薇无菌苗：取当年生带腋芽茎段自来水冲洗 30 min 后，75% 酒精处理 10 s，再用 0.1% 次氯酸钠 (加 0.1% 吐温－20) 浸泡 8～10 min，稍加摇动，取出后用无菌水冲洗 4～5 次，接种于不定芽的诱导培养基上。

1.3 培养条件

不定芽的诱导：切去无菌茎段两端已褪色的组织，将茎段切成 1～2.0 cm 长的小段，接种于诱导分化的培养基上，培养基为改良 (黄科和余小林等，2004) MS+ 40 g/L 蔗糖+ 6.0 g/L 琼脂粉+ 3.5 mg/L $AgNO_3$ + 2.0 mg/L 6-BA/1.0～3.5 mg/L CPPU + 0.1～0.6 mg/L 2，4-D (pH 5.8)。每瓶接种一个，共 30 瓶，重复 3 次。培养室温度为 (25±2) ℃，光强约 30 μmol/m^2. s，每天光照 10～12 h。30 d 继代一次。

不定芽的增殖：将长约 1～1.5 cm 的芽接种到增殖培养基上继代培养。基本培养基为改良 MS+ 40 g/L 蔗糖 + 6.0 g/L 琼脂粉+ 3.5 mg/L $AgNO_3$ + 1.5 mg/L CPPU+ 0.05～0.1 mg/L 2，4-D+ 0.05～0.1 mg/L GA_3。培养条件同上。30 d 继代一次。

待不定芽生长到 1.5～2 cm 时，自基部切下，移至生根培养基，培养条件同上。不定根诱导成功后按常规方法对再生植株进行移栽。

上述数据均采用 DPS 统计软件进行统计分析 (唐启义和冯明光，2002)。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

2.1.1 6-BA 与2，4-D 配合对不定芽分化的影响

根据文献报道与预试验 (Barve 等，1984; Debasis 等，2000)，确定 $AgNO_3$ 的添加浓度为 3.5 mg/L，6-BA 的添加浓度为 2.0 mg/L，生长素 2，4-D 设 0.1～0.6 mg/L 等 6 个浓度梯度配成 1～6 号分化培养基，并将无菌外植体接种于这些培养基上，30 d 后在 1、2、3、4、5、6 号培养基上都有不定芽的分化 (表 1)，以 3 号分化率最高，增殖率为 3。

对表 1 中不定芽诱导频率作进一步的统计分析，结果显示，PGR 组合的不定芽再生频率的 F 值为 317.3813，*P* 值为 2.6E-12，$F_{0.05}$ 为 3.1059，均达到极显著的差异水平。说明2，4-D 的适宜浓度为 0.3 mg/L。表 2 显示：3 号处理与 4、2、1、5、6 之间差异极显著，说明 3 号配方是最佳配方。

2.1.2 CPPU 与2，4-D 配合对不定芽分化频率的影响

为了比较不同细胞分裂素对狗蔷薇离体培养

表 1 6-BA 与2，4-D 组合对狗蔷薇不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of combinations of 6-BA and 2，4-D on adventitious buds induction of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR (mg/L)		接种数 Incubation No.	不定芽分化数 Differentiation No. of adventitious buds	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds (%)	增殖率 The multiplication rate
	6-BA	2，4-D				
1	2.0	0.1	89	55	62	2.0
2	2.0	0.2	89	60	67	2.3
3	2.0	0.3	90	78	87	3.0
4	2.0	0.4	90	64	71	2.5
5	2.0	0.5	86	53	62	2.0
6	2.0	0.6	90	40	45	1.5

植株再生能力的影响，在筛选出2,4-D的浓度为0.3 mg/L以后，又添加6个不同的浓度的CPPU（1、1.5、2、2.5、3、3.5 mg/L），筛选出适宜的不定芽分化的CPPU浓度（表2）。

表2　**6-BA与2,4-D**组合中两两之间差异比较

Table 2　Comparison of different combinations of 6-BA and 2,4-D on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率（%）	差异显著性	
		0.05	0.01
3	87	a	A
4	71	b	B
2	67	c	C
1	62	d	D
5	62	d	D
6	45	e	E

将无菌外植体接种于1~6号分化培养基上，外植体5天后开始萌动，经过约25天的诱导逐步诱导出丛生芽。结果表明，CPPU与2,4-D的PGR组合对不定芽的诱导率整体高于6-BA与2,4-D的PGR组合的诱导率；增殖率也明显高于6-BA与2,4-D的PGR组合。以1.5 mg/L CPPU+0.3 mg/L 2,4-D的组合较为合适，增殖率为5。对CPPU与6-BA的效果差别做显著性测验，$t=3>t_{3,0.05}=2.776$，表明差异显著。因此，CPPU的作用效果要比6-BA好。

对表3中不定芽诱导频率作进一步的统计分析，结果显示，PGR的组合的不定芽再生频率的F值为196.3，P值为4.48E-11，$F_{0.05}$为3.1059，均达到极显著的差异水平。说明2号配方为最佳不定芽诱导的培养基，CPPU的适宜浓度为1.5 mg/L。表4显示：2号处理与4、3、1、5、6之间差异极显著，说明2号配方是最佳配方。

表3　**CPPU与2,4-D**组合对狗蔷薇不定芽诱导的影响

Table 3　Effect of different combinations of CPPU and 2,4-D on adventitious buds induction of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR（mg/L）		接种数 Incubation No.	不定芽分化数 Differentiation No. of adventitious buds	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds（%）	增殖率 The multiplication rate
	2,4-D	CPPU				
1	0.3	1.0	90	60	67	4.0
2	0.3	1.5	89	83	93	5.0
3	0.3	2.0	88	65	74	4.3
4	0.3	2.5	89	70	79	4.5
5	0.3	3.0	90	58	64	3.5
6	0.3	3.5	87	46	52	3.0

表4　**CPPU与2,4-D**组合中两两之间差异比较

Table 4　Comparison of different combinations of CPPU and 2,4-D on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率（%）	差异显著性	
		0.05	0.01
2	93	a	A
4	79	b	B
3	74	c	C
1	67	d	D
5	64	d	D
6	52	e	E

2.2　不定芽的增殖

确定CPPU的浓度为1.5 mg/L，生长素2,4-D设0.05，0.15，0.1 mg/L 3个浓度梯度，赤霉素GA_3设0.05，0.1 mg/L 2个浓度梯度配成1~6号增殖培养基（Davis，1980；Debasis等，2002），并将不定芽接种于这些培养基上，30天后在6种培养基上都有不定芽的分化（表3），以4号的增殖率最高，增殖率为5.5（表5）。

对表5中不定芽增殖诱导作进一步的统计分析，结果显示，PGR的组合的不定芽增殖频率的F值为104.1375，P值为1.86E-09，$F_{0.05}$为3.1059，均达到极显著的差异水平。说明4号配方为最佳不定芽增殖培养基，GA_3的适宜浓度为0.05 mg/L，2,4-D的适宜浓度为0.1 mg/L。表6显示：4号处理与3、6、2、1、5、之间差异极显著，说明2号配方是最佳配方。

2.3　生根及移栽成苗

待不定芽长至1.5~2 cm时，转至生根培养基。结果表明，1/4 MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+20 g/L蔗糖+3.5 g/L琼脂+0.3 g/L活性炭的生根培养基最适于狗蔷薇的生根，生根率达91%，且均为丛生根。

30天形成完整的根系后，移植到过渡基质上，30天后小苗成活。

表5 不同生长调节物质组合对狗蔷薇不定芽增殖的影响

Table 5 Effect of combinations of different PGR on adventitious buds multiplication of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR (mg/L)		接种数 Incubation No.	分化数 Differentiation No.	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds (%)	增殖率 The multiplication rate
	2,4-D	GA_3				
1	0.05	0.05	86	55	64	2.5
2	0.05	0.1	89	63	71	4.5
3	0.1	0.1	87	69	79	4.0
4	0.1	0.05	90	80	89	5.5
5	0.15	0.1	84	54	64	2.3
6	0.15	0.05	90	68	76	3.0

表6 **2,4-D** 和 **GA_3** 组合中两两之间差异比较

Table 6 Comparison of different combinations of 2,4-D and GA_3 on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
4	89	a	A
3	79	b	B
6	76	c	B
2	71	d	C
1	64	e	D
5	64	e	D

3 讨论

目前，国内外对蔷薇属植物的组培报道(Syamal and Singh, 1996; 杨倩和彭春生, 2003)，主要采用的细胞分裂素类物质包括6-BA、KT、ZT等，以及生长素类如IAA、NAA、IBA、2,4-D等，其中以6-BA、NAA的组合最多，6-BA的浓度一般为1.0～2.5 mg/L，NAA一般为0.1～1.0 mg/L，但离体植株再生频率均在40%～50% (Ibrahim and Debergh, 2001; De Wit and Esendam, 1990)，再生频率较低。本实验以狗蔷薇的离体茎段为试材，采用6-BA与2,4-D以及CPPU与2,4-D两种PGR组合来研究狗蔷薇不定芽发生情况，建立高效的狗蔷薇离体培养再生体系。

CPPU是苯基脲类细胞分裂素，一种新型植物生长调节剂，具有嘌呤型细胞分裂素更强的细胞分裂活性。具有良好的促进花芽分化、保花、保果、使果实膨大和诱导单性结实及延缓衰老等方面的作用(李英等, 2001)。应用于蔷薇属植物的组培中还未见相关的报道。本实验采用CPPU和6-BA分别于2,4-D组合，比较了两种细胞分裂素对狗蔷薇植株再生作用上的差异，结果显示，CPPU的作用效果要比6-BA好，增殖倍数由3提高到5。适宜的CPPU浓度为1.5 mg/L。

生长素在组织培养中主要被用于诱导刺激细胞的分裂和根的分化，对培养物的形态建成起着极其重要而明显的作用，细胞分裂素和生长素的比值大时促进不定芽的形成(Ibrahim and Debergh, 2001)。本实验表明，在不定芽的诱导中2,4-D以0.3 mg/L浓度较适合，在不定芽的增殖中2,4-D以0.1 mg/L的浓度较适合。

GA_3 有促进不定芽和幼株伸长的作用。组培蔷薇属植物时，往往在丛生芽的诱导阶段，适量加入有利于芽的再生(Barvet 等, 1984; Syamal and Singh, 1996)。本实验在继代培养中，加入0.05 mg/L GA_3 可促进芽的增长。

〔参 考 文 献〕

唐启义，冯明光著，2002. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京：科学出版社，55—59

Barve DM, Lyer RS, Kendurkar S, *et al*, 1984. An effective method for rapid propagation [J]. *Indian Journal of Horticulture*, **41** (1-2): 1—7

De Dood J, Rademaker J, 1990. From the dtur trial in the Noordoostpolder [J]. *Vakblad voor de Bloemistery*, **45** (40): 72—73

Davis DR, 1980. Rapid propagation of roses *in vitro* [J]. *Scientia Horticulturae*, (4): 385—389

Debasis C, Azad MAK, Datta SK, 2000. *In vitro* propagation of rose cultivars [J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, **5** (2): 189—192

De Wit JC, Esendam HF, 1990. Matic embryogenensis and plant regeneration of flowering plants in rose [J]. *Plant Cell Rep*, (9): 456—458

Huang K (黄科), YU XL (余小林), WU QY (吴秋云), *et al*, 2004. The Optimization of Plant Regeneration Protocol of Chinese Broccoli [J]. *Chinese Journal of Cell Biology* (细胞生物学杂志), **26** (3): 313—316

Ibrahim R, Debergh PC, 2001. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of rose [J]. *Scientia Horticulturae*, **88** (1): 41—57

Liang YH (梁艳华), Peng CC (彭春生), 2004. Select of rootstocks of tree roses [J]. *North Horticulture* (北方园艺), (4): 38—39

Li Y (李英), Yu JQ (喻景权), Zhu ZJ (朱祝军), *et al*, 2001. Fruit growth, cell division and endogenous hormones level in parthenocarpic fruit formed by CPPU induction in *Lagenaria leucantha* [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **27** (2): 167—172

Syamal MM, Singh SK, 1996. *In vitro* propagation of rose [J]. *Horticultural Journal*, **9** (1): 57—62

Yang Q (杨倩), Peng CC (彭春生), 2003. Domestitate rapid propagation on rootstocks of tree roses [J]. *J Beijing Forest Univ* (北京林业大学学报), **25** (2): 85—93

* * * * * * * * * * * * * * *

资讯

能源植物专题资料汇编

能源缺乏逐步成为人类面临的最大危机，同时矿物能源燃烧所产生的有害物质严重污染了环境，导致温室效应等诸多生态问题。生物能源具有可再生性，自我分解的绿色环保性，正逐步替代矿物能源。

能源植物通常指那些具有合成较高还原性烃的能力，可产生接近石油或柴油成分并可替代石油或柴油产品使用的植物，以及富含大量油脂的植物（费世民，2005）。

能源植物主要分为三类，其一富含类似石油成分的能源植物，石油的主要成分是烃类，富含烃类的植物是植物能源的最佳来源，生产成本低，利用率高。其二富含碳水化合物的能源植物，利用这些植物所得到的最终产品是乙醇，如甘蔗农作物。其三富含油脂的能源植物（丁向阳，2004）。

到目前为止，能源植物有草本、乔木、灌木类，主要集中在夹竹桃科、大戟科、萝藦科、菊科、桃金娘科以及豆科。全世界已经发现40多种能源植物，有续随子、绿玉树、橡胶树、西蒙德木、甜菜、甘蔗、木薯、苦配巴树、油棕榈树、南洋油桐树、澳大利亚的阔叶木、黄连木、象草等。

中国植物区系成分复杂、种类繁多，其中能源植物种类之多在世界上屈指可数。到目前为止，含油植物资源有151科697属1553种，其中种子含油量在40%以上的植物有154种（王涛，2005）。目前大部分的能源植物处于野生或半野生状态，科研人员正在利用遗传改良、人工栽培或先进的生物技术手段，通过生物质能转换技术提高利用生物能源的效率，生产出各种清洁燃料。

研究著作:

1. Chris Hayhurst, 2003.《Biofuel Power of the Future: New Ways of Turning Organic Matter Into Energy》. Rosen Publishing Group Inc.
2. N E Bassam, 1998.《Energy Plant Species: Their Use and Impact on Environment and Development》. James & James/Earthscan Science publisher.
3. 李昌珠，蒋丽娟编，2005.《清洁燃料丛书——生物柴油（绿色能源）》，化学工业出版社.
4. 袁振宏，吴创之等编著，2005.《可再生能源丛书——生物质能利用原理与技术》，科学出版社.
5. 张卫明 编著，2005.《植物资源开发研究与应用》，东南大学出版社出版.
6. 中国科学院能源战略研究组 编，2006.《中国能源可持续发展战略专题研究》，科学出版社.

综述文献:

1. Amber M. Roth *et al*., 2005. Grassland bird response to harvesting switchgrass as a biomass energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 28 (5): 490-498
2. Dalia Streimikiene, *et al*., 2005. Review of renewable energy use in Lithuania. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9 (1): 29-49
3. Fangrui Ma, Milford A. Hanna, 1999. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology*, 70 (1): 1-15
4. James S. McLaren, 2005. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends in Biotechnology*, 23 (7): 339-342
5. Jan Cloin, 2005. Biofuels in the Pacific: Coconut oil as a biofuel in Pacific islands. *Refocus*, 6 (4): 45-48
6. Murphy JD, McCarthy K, 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, 82 (2): 148-166

〔下转**222**页〕